

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

SULFATED POLYSACCHARIDE DS 4152 AND VASCULARIZATION INHIBITOR AND ANTITUMOR AGENT CONTAINING THE SAME

Patent Number: JP63119500
Publication date: 1988-05-24
Inventor(s): INOUE KAZUKIYO; others: 03
Applicant(s): DAI ICHI SEIYAKU CO LTD
Requested Patent: JP63119500
Application Number: JP19870125443 19870522
Priority Number(s):
IPC Classification: C07K15/14; A61K31/725; A61K37/02; C08B37/00; C12P19/04
EC Classification:
Equivalents: JP2544136B2

Abstract

NEW MATERIAL: A sulfated polysaccharide DS 4152 having the following physical and chemical properties. Molecular weight, 29,000+ or -3,000; elemental analysis (%), C 24.42-25.76, H 3.34-3.98, N 0.51-0.89, S 10.6-11.7, P 0.77-1.06; sugar content, 57+ or -3; protein content, 1+ or -0.5; specific rotation, $[\alpha]_D^{25} = -37+$ or -1 deg. (0.5% aqueous solution); main IR absorption band, 1,240, 840 (shoulder), 810 (cm^{-1} ; KBr); solubility, easily soluble in water and almost insoluble in organic solvents such as ether, benzene, chloroform, methanol, ethanol, etc.; pH, 6-8 (3% aqueous solution); etc.

USE: A vascularization inhibitor and antitumor agent. The activity can be promoted when combined with a steroid drug.

PREPARATION: For example, pyrogenic substance, etc., having a molecular weight of $\geq 15 \times 10^4$ are removed by a proper molecular weight fractionation method from DF 4639 separated from a cultured product of *Arthrobacter* sp. AT (FERM P-5255).

Data supplied from the esp@cenet database - I2

1985

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑩ 公開特許公報(A)

昭63-119500

④ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

④ 公開 昭和63年(1988)5月24日

C 07 K 15/14
A 61 K 31/725ABL
ABY

8318-4H

7252-4C ※ 零支請求 未請求 発明の図 5 (全13頁)

④ 発明の名称 硫酸化多糖体 D S 4152並びにこれを含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤

④ 特 願 昭62-125443

④ 出 願 昭62(1987)5月22日

④ 優先主張 ④ 昭61(1986)5月23日 ④ 日本(JP) ④ 特願 昭61-118847

④ 発 明 者 井 上 和 弘 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内

④ 発 明 者 田 中 紀 子 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内

④ 発 明 者 是 永 博 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内

④ 出 願 人 第一製薬株式会社 東京都中央区日本橋3丁目14番10号

④ 代 理 人 弁理士 有賀 三幸 外2名

最終頁に続く

明 細 書

グラフト重合体)

1. 発明の名称

蛋白含量(%) : 1 ± 0.5 (ローリー・フォ

硫酸化多糖体 D S 4152 並びにこれを含有

リン法、牛血清アルブミン

する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤

重合体)

2. 特許請求の範囲

(4) 比較例

1. ナトリウム塩として下記の物理化学的性質

 $(\alpha)_D^{20} -37^\circ \pm 1^\circ$ (0.5%水溶液)

を有する硫酸化多糖体 D S 4152。

(5) 紫外線吸収スペクトルにおける主要吸収有

(1) 分子量(ゲルろ過法による)

1240, 840(肩), 810(m^{-1} ; KBr)28000 \pm 3000

(6) 溶解性

(2) 元素分析値

水に易溶。エーテル、ベンゼン、クロロホルム、

C 24.42~25.76% H 3.34~3.98%

メタノール、エタノール等の有機溶媒

N 0.51~0.59% S 10.6~11.7%

には殆ど不溶。

P 0.77~1.06%

(7) 着色反応

(3) 糖および蛋白質の含量

フェノール-硫酸、アンスロン-硫酸、ビ

糖含量(%) : 57 ± 3 (フェノール-硫酸法、

ムレフト反応およびローリー・フォリン反応

は陽性。水溶液のエルソン・モルガン反応およびエンヒドリン反応も陽性。カルバゾール反応および坂口反応は陰性。

(8) 塩基性、中性、酸性の区別

pH 6~8 (3% 炭酸水溶液)

(9) 構成要素および炭素量、窒素の含量

D-グルコース、D-ガラクトース、 $2O_2N$

およびP(糖)の含有モル比はD-グルコースを10としてそれぞれ10:61:73:6である。

(10) 構成アミノ酸およびアミノ酸

炭加水分解物のアミノ酸分析計による分析で、アラニン、グリシン、グルタミン酸、シロイソロシン酸、グルコサミンおよびムラニン酸の存在を認める。

水の電導度5項記載の血管新生抑制剤。

2 炭酸化多環体D8 4152 と、ステロイド剤とを有効成分として含有する抗腫瘍剤。

3 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、新炭酸化多環体D8 4152並びにこれを有効成分として含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤並びにこれと更にステロイド剤を含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤に関する。

(従来の技術及びその問題点)

従来、シクロコファス09:AT-28の発癌生動物中に腫瘍誘導作用、感染抑制作用およびインターフェロン誘起作用を有する炭酸化多環体D8 4639が存在することが知られて

2 炭酸化多環体D8 4152を有効成分として含有する血管新生抑制剤。

3 リューマチ性関節炎、増殖性関節炎、乾癬、糖尿病性関節炎、未熟児関節症に有効な特許請求の範囲第2項記載の血管新生抑制剤。

4 炭酸化多環体D8 4152を有効成分として含有する抗腫瘍剤。

5 炭酸化多環体D8 4152と、ステロイド剤とを有効成分として含有する血管新生抑制剤。

6 ステロイドが糖質コルチコイド類、黄体ホルモン類、エストラン類及びアンドロステタン類から選ばれたものである特許請求の範囲第3項記載の血管新生抑制剤。

7 リューマチ性関節炎、増殖性関節炎、乾癬、糖尿病性関節炎、未熟児関節症に有効な特許請求の範囲第4項記載の血管新生抑制剤。

いた(特開昭56-67301号、特開昭57-42627号および特開昭59-25329号)。

本発明者らは、種々の有用性の期待される炭酸化多環体D8 4639について生物学的特性を明らかにすべく検討をかねた結果、D8 4639が強い発癌性を有することを知った。

(問題を解決するための手段)

そこで、本発明者らは、この発癌性物質を除去すべく、更に研究をかねたついでとて、D8 4639は、いくつかの成分の混合物であり、そのうちのD8 4152と名づけられた一成分は発癌性がなく、しかも優れた血管新生抑制作用及び抗腫瘍作用を有することを見出した。

更にまた、本発明者は、この03 4152 とステロイド剤とを組合せると血管新生抑制作用及び抗腫瘍作用が相乗的に増強されることを見出した。

本発明は、上記の知見に基づくものであり、その目的は、新規な免疫化多糖体03 4152を提供するものである。

また、本発明の他の目的は、免疫化多糖体03 4152を有効成分として含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤を提供するものである。

更に、本発明の他の目的は、免疫化多糖体03 4152とステロイド剤とを有効成分として含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤を提供するものである。

本発明中の「血管新生抑制」とは、癌の

発育、実体形成、転移の過程等に極めて重要なだけでなく、異形リユーマを含む慢性炎症、免疫応答、腫瘍増殖等の病的状態においてもその病体の進展に深く関与している血管の新生作用を抑制することをいう。したがって、血管新生抑制剤は、上記血管の新生作用が亢進する諸疾患、例えばリユーマ性関節炎、増殖性網膜炎、乾眼、糖尿病性網膜炎、未熟児網膜症等の治療、予防に有用なものである。特に腫瘍は強い血管新生を促し、新生された血管より供給される血液がさらに腫瘍の増殖と進展を促進するとされているので、抗腫瘍剤としても有効である。

本発明の免疫化多糖体03 4152は、アルスロバクター 99.A7-25 (工業技術院微生物

物工業技術研究所には、Microcococcus sp. A7-25として、FERM P-5255及びArthrobacillus sp. A7-25としてFERM BP-1357の番号で寄託されている)の培養物から分離されるDP 4639 (特開昭60-67301号参照)から、その中に含まれる分子量の約 1.5×10^4 以上の免疫性物質等を選別した分子量分離法、例えばゲルろ過法や限外ろ過法、アルコール沈殿法で除くことによつて得られる。

すなわち、ゲルろ過法によればDP 4639を選別したゲルろ過液、例えば、セファクリル(Sephacryl S-300 (ファルマシア製))を用いてゲルろ過を行い、得られるフラクションについて高濃ゲルろ過クロマトグラフイ

ー(東洋ソーダ製G3000 SWカラム使用)を行い、排除限界(ボイド・ボリューム、void volume)にピークを示すフラクション(8面分)とボイド・ボリュームにピークを与えず分子量の約 $2 \times 10^4 \sim 8 \times 10^4$ の範囲に抽出されるフラクション(1面分)をそれぞれ、透析する。

また、限外ろ過は通常の膜(例えばAmicon社製のYM10、YM30、XM50、PM30やMillipore社製のNOVA100、OMEGA100、NOVA50、OMEGA50等特許YM10)を用い、窒素ガスによる加圧またはペリスメリック(peristaltic)ポンプによつて加圧(0.5~5kg/cm²程度)し、透過液を03 4152として採ればよい。使用液は、水-エタ

特開昭63-119500(4)

C 34.42~35.76% E 33.4~39.8%

N 0.51~0.89% S 1.06~1.17%

P 0.77~1.06%

(2) 還元糖と蛋白質の含量

還元糖(%) : 5.7 ± 3 (フェノール-硫酸

法、ガラクトース標準)

蛋白質含量(%) : 1 ± 0.5 (ローリー・フォ

リン法、牛血清アルブミン

標準)

(4) 比旋光度

$(\alpha)_D^{25} -37^\circ \pm 1^\circ$ (0.5%水溶液)

(5) 赤外線吸収スペクトルにおける主要吸収帯

1240, 840 (肩), 810 (cm^{-1} ; KBr)

(6) 溶解性

水に易溶。エーテル、ベンゼン、クロロホルム

ノール(10:2~3)または水が適当である。4で乃重置置で行なうのが一般的である。

得られた各遊析液を蒸発後ろ過し、ろ液を数倍量のエタノール中に沈降下注することにより生成する白色沈澱を乾燥、90%エタノール、エタノール、アセトンの順に洗った後、減圧乾燥すれば、目的とする0.4152(1面分)と同熱性物質(2面分)が各々得られる。

こうして得られる0.4152は以下に述べる物理化学的性質を示す。下記の物性はそのナトリウム塩についてのものである。

(1) 分子量(ゲルろ過法による)

29000 ± 3000

(2) 元素分析値(S=ソフトの巾を示す)

ルム、メタノール、エタノール等の有機溶媒には殆ど不溶。

(7) 显色反応

フェノール-硫酸、アンスロシン-硫酸、ピロリット反応およびローリー・フォリン反応は陽性。水溶液のエルソン・マルガン反応およびユンヒドリン反応も陽性。カルベソール反応および坂口反応は陽性。

(8) 塩基性、中性、酸性の区別

pH 6~8 (3%濃度水溶液)

(9) 構成糖および炭酸基、銅の含量

D-グルコース、D-ガラクトース、30,Na

およびP(銅)の含有モル比はD-グルコースを10としてそれぞれ約10:61:73:6である。

(10) 構成アミノ酸およびアミノ酸

加水分解物のアミノ酸分析計による分析で、アラニン、グリシン、グルタミン酸、シロイノビリン酸、グルコサミンおよびムン酸の存在を認める。

以上の0.4152は、後記実施例で示す如く、単独でも血管新生抑制作用を有するものであるが、ステロイド剤と組合せることにより、更に優れた血管新生抑制作用を示す。

尚、本発明の血管新生抑制剤においては、0.4152の代りにヘパリン、低分子ヘパリン等を使用することもできる。

従来、アレフェゾロン、6-メチルアレフェゾロン、デキサメタゾン等のステロイドホルモンが、癌促進作用、発がん、ヘムステ

一服投に実験的に誘導された血管新生を抑制する作用を有することが報告されている

(Cancer, Res. 39 1308(1979) J. Hall,

Cancer Inst. 57 769(1976)及びProc.

Natl. Acad. Sci. USA 78 1176(1981))。

また、ステロイドホルモンのうち、雄質コルチコイド(プレドニゾン、プレドニゾン、メチルプレドニゾン等)は白血病、悪性リンパ腫、乳癌、前立腺癌の治療に使用されている。

更に、アンドロステンを母核とする男性ホルモンであるテストステロンプロピオネート、フルオキシメステロン等が乳癌腫瘍として用いられており、20~30%の有効率が得られると報告されている(Osborne 10 72(1984))。

ゾンおよびその誘導体(アセチート、ヘキサチネート、フオスフエート、ブチルアセチート、ナトリウムフオスフエート、トリメチルアセチート等)；メチルプレドニゾンおよびその誘導体(アセチート、ヘキサチネート等)；メチルプレドニゾンおよびその誘導体(アセチート、ヘキサチネート等)；メチルプレドニゾンおよびその誘導体(アセチート、ヘキサチネート等)；メチルプレドニゾンおよびその誘導体(アセチート、ヘキサチネート等)が挙げられる。

また、グルココルチコイドのC-11位の水素置換が配位になつた異性体(たとえば、11 α -エピヘイドロコルチゾン)も含まれるし、前記グルココルチコイドのナトリウム塩(グルココルチコイド塩の有機は置換しきい)も含まれる。

更に、黄体ホルモンであるプロゲステロン、

更にまた、プロゲステロンの誘導体、テストステロンの誘導体およびエストロゲン類が前立腺癌の治療に用いられている。

前記の08 4152と組合せ用いることのできるステロイド類は、雄質コルチコイド類、黄体ホルモン類、エストロゲン類及びアンドロステン類等であり、より具体的には次のものが例示される。

(1) プレドニンを母核とするステロイドホルモン、すなわちグルココルチコイドであり、たとえばコーチゾンおよびその誘導体(アセチート、エナンチート、ラングシレート等)；ヘイドロコルチゾンおよびその誘導体(アセチート、ヘキサチネート、カプロエート等)；プレドニゾンおよびその誘導体；プレドニ

メドキシプロゲステロンおよびその誘導体(アセチート等)；デイドロゲステロンおよびその17 α -アセチル誘導体(デムフアストン)等が挙げられる。

更にまた、メタロコルチコイドであるアルドステロン、デソキシコルチコステロンおよびその誘導体(アセチート、トリメチルアセチート、エナンチート、フエニルプロピオネート等)も挙げられる。

(2) アンドロステンを母核とするステロイドホルモン、すなわち、男性ホルモンであり、たとえば、アンドロステロン、テストステロンおよびその誘導体(プロピオネート、エナンチート、ブチレート、カプリレート等)が挙げられる。また、エピテストノールおよび

特開昭63-119500 (B)

その誘導体、イピナオスチンがあげられる。
さらにフルオキシノスタロンおよびその誘導体、ノタルナストロンおよびその誘導体、スタノロンおよびその誘導体も含まれる。

(1) エストランを母核とするステロイドホルモン、すなわち、性腺ホルモンであり、たとえば、エストロンおよびその誘導体、エストラジオールおよびその誘導体（ベンゾエート、ジプロピオネート、バレレート、ウンデセノエート等）、エストリオールおよびその誘導体（トリプロピオネート等）があげられる。

本発明の血管新生抑制剤の用途としては、有効成分を医学的に許容される媒体、錠形剤を含有する種々の形態、例えば水または各種の塩酸用剤に溶解させた液剤、散剤、錠剤

である。注射による投与の場合は通常経口の1/5量が適量である。

また、本発明の血管新生抑制剤を抗癌剤として用いる場合の投与方法及び用量も、ほぼ上記と同じである。

(発明の効果)

本発明の昭4152はそれ単独でもつても血管新生抑制作用を有するが、これを更にステロイド剤と組合せるとより優れた血管新生抑制作用を有する。

したがって、昭4152単独でもつても血管新生抑制剤として有用であるが、更にステロイド剤と組合せたものは相乗的に作用が増強されるので、例えば腫瘍血管の新生を抑制し、癌の増殖を防ぐ血管新生抑制剤として有

用、錠剤、注射剤、液剤等が挙げられる。

本発明の血管新生抑制剤が昭4152とステロイド剤とを含有するものである場合、これらをそれぞれ別個に上記剤型の単剤に調製して組合せ剤とすることも、あるいは両成分を混合剤とし製剤化することもできる。

本発明の血管新生抑制剤は、経服内、お尻内、経口、皮下、直腸内、粘膜内または患部局所内に投与することができる。その投与量は、成人の経口一日量で、昭4152として1~2000mg程度であり、ステロイド類は男性ホルモン用、副腎コルチコイド用で10~1000mg、通常30~60mgが適量で、調製していくのが好ましいことがある。プロゲステロン用では100~1200mgが適量

に有用なものである。

(実施例)

次に実施例を挙げ、本発明を更に詳しく説明する。

実施例1(A)

特開昭56-67301号に記載の方法により得られたDF 4639 (50g)を15mlの0.1M NaClに溶解し、これを0.1M NaClで平衡化したカラム（セファゲルS-300；50×80cm）にかけて同様に抽出し、16mlずつ抽出液を集めた。得られたフラクションについて高速ゲル透過クロマトグラフィー（東洋ソーゲル 93000 SWカラム、溶媒0.1M酢酸カリウム緩衝液pH 6.5）を行い、ディフ・ディュームC-27を与えず、

特開昭63-119500(7)

DS 4152 の物理化学的性質および生物学的性質を DP 4639 と比較して示す。

(a) 糖、蛋白、S および P 含量 (第 1 表)

第 1 表

	1)	2)	3)	4)
	糖 (%)	S (%)	蛋白 (%)	P (%)
DS 4152	56	1.11	1.1	0.86
DP 4639	54	1.08	1.3	0.86
糖 分	42	7.9	7.6	0.72

1) フェノール-硫酸法 (ガラクトース換算)

2) アントノビチス法 (C.A. Antopolovskii, *Acta Chem. Scand.* 16, 1521 (1962))

K による

3) ローリー-フォリン法 (牛血清アルブミン換算)

4) チエンらの方法 (P.S. Chen et al., *Anal. Chem.* 28, 1756 (1956)) K による

分子量 (デkastラン法) が約 2×10^4 ~ 8×10^4 の範囲に属するフラクションを調べる (約 700 ml)、脱イオン水に対して透析した。透析液を約 50 ml で濃縮後ろ過した。ろ液を約 400 ml のエタノール中へ投下して、生成した沈殿を調べる。これを 90% エタノール、エタノール、アセトンの順に洗った後、減圧乾燥 (50℃, 6 時間) して目的物の DS 4152 の白色粉末 3.6 g を得た。

一方、上記高濃度アルブミンクロマトグラフィーでバインド・ポリマーにピークを与えるフラクションを調べる (約 90 ml)。上述の DS 4152 の場合と同様に処理して、糖 分を黄色粉末として 0.18 g を得た。

(b) ガラクトース、グルコース、糖 分および糖の組成モル比

試体を 1 規定濃度中 100℃ で 5 時間加水分解しイオン交換樹脂で脱塩処理した後、常法によりアルジトールアセテートとしてガスクロマトグラフィーで分析した。また、糖 分および糖のモル比は、S および P の含量 (%) から算出した。

第 2 表

	ガラクトース	グルコース	糖 分	糖
DS 4152	61	1.0	7.3	0.6
DP 4639	62	1.0	7.3	0.6
糖 分	62	1.0	6.9	0.6

第 2 表は、グルコースを 1.0 モルとした場

合の各成分のモル比の 1 例である。

(c) 糖 アミノ酸およびアミノ糖の同定

DS 4152 を 3 規定濃度中、100℃ で 16 時間加水分解した後、常法によりアミノ糖分析にて分析した結果、アラニン、グリシン、グルタミン酸、シアル酸、アミノ糖、グルコサミンおよびムラミンのピークを認めた。

(d) 比旋光度: $(\alpha)_D^{20}$ ($c=0.5$, 水)

第 3 表

	比旋光度
DS 4152	-37
DP 4639	-36
糖 分	-34

(e) グルコース誘導体パターン

第 1 図、第 2 図および第 3 図に、それぞれ

特開463-119500 (B)

あると規定される。

(N) 発熱性試験

日本薬局方(第10改正)に基づいて行つた発熱性試験の結果を第4表に示す。

以下余白

DS 4152、DP 4639 およびH部分の高濃ゲル透過クロマトグラムを示す(夏井ソーシロ 3000 SWカラム使用、溶媒0.1M酢酸カリウム緩衝液pH 8.5、0.9 ml/分、標準物質デキストランT-10およびT-40)。

(i) 紫外線吸収スペクトル

2 mg/ml水溶液において220~340 nmに最大吸収は認められない。

(ii) 紫外線吸収スペクトル (KBr錠)

1240、840 (nm) および810 cm^{-1} KBr錠に酸化多糖に特徴的な吸収を示す。

DS 4152 の構造としては、主としてD-ガラクトースとD-グルコースから成る糖質部分にムライン酸フォスフェートを介してメチルアフリカン部の結合した硫酸化多糖体

第4表

試料	用量 mg/1.0ml	体積上昇値					
		合計	+	+	+	+	+
DS 4152	75	0.20	0.10	0.15	0.45		
DP 4639	375	0.20	0.80	0.20	0.90		
H部分	15	1.85	1.25	1.40	4.20		
	75	1.40	2.00	1.80	5.20		
	15	1.90	1.40	2.20	5.50		
	75	1.90	1.75	2.65	6.20		

・+ (補注) ・- (減注)

(i) DS 4152 の急性毒性(マウス、静注)は、LD₅₀が2000 mg/kg以上である。

実施例1 (ii)

DP 4639 (2.0 g) を300 mlの水-エタノール(10:3)溶液に溶解し、YM10膜(418 cm^2 、アicon社製)を用いて、真空で加圧(1.5 kg/cm²)下、真価で限外ろ過した。上記溶液を通過しながら透過液量が約3 Lとなるまで実施した。透過液の濃糖液(約50 ml)に100 mgの酢酸ナトリウムを加えて溶解した後、遠心分離により得られる上清を約500 mlのエタノール中へ段階下ろした。生成した沈殿を洗い、90%エタノール、エタノール、アセトンの順に洗った後、減圧乾燥(65℃、5時間)してDS 4152

0白色粉末337を得た。

このものの物理化学的性質は、次に示す通り、
蛋白、S及びPの含量を除き、実測例1(4)の
DS 4152と同一であつた。

糖含量 55%
S含量 11.3%
蛋白含量 0.9%
P含量 0.92%

高速ゲル浸透クロマトグラムを第4図に示す
(0.3000 Mカラム、0.1 M酢酸ナトリウム緩衝液(pH 6.8)、0.8 ml/分)。

実測例2

局所性尿蛋白腎生阻止試験(直接法)：

局所を用い、タイラーとフオーマン

(*Metazo* 297:307,(1962))の方法を—

べた。ステロイドとしては、助成コルチゾン
を0.5 mg/局所の量(血管新生に影響のない量)を用いた。また、比較として、DP 4639
及びE成分についてもその活性を調べた。この結果を第5表に示す。

第5表

50%血管新生阻止量(ID₅₀値)

	DS 4152	DP 4639	E成分
ID ₅₀ 値 (mg/局所)	3	30	600

実測例4

実測例2と同様な方法で、各種ステロイド
とDS 4152の併用によるID₅₀値の変化を検討した。この結果、種々のステロイドに10

特開63-119500 (9)

部改良した以下の方法で行つた。

局(ノーランクロス)の4~6日計受持用
の尿尿尿に、生理食塩水で溶解したDS 4152
又はヘパリンを加し、37℃で培養した。

培養後2日後に、尿尿尿尿の尿尿尿尿を
生理食塩水のみを加した対照と比較し、ア
ロピット法により、50%血管新生阻止量
(ID₅₀値)を算出した。

この結果、本発明のDS 4152のID₅₀値
は、100 mgである。これに対し、ヘパ
リンは、100 mgでも作用を示さなかつた。

実測例3

局所性尿蛋白腎生阻止試験(直接法)：

実測例2と同様にして、ステロイドと

DS 4152を併用した場合の効果について調

べた。DS 4152を加えれば、それぞれの局
所性尿蛋白腎生阻止活性が10~100倍
に増加することが明らかとなつた(第6表)。

第6表

ステロイド	ID ₅₀ 値(mg/局所)	
	単独	DS 4152(増加 と併用)
コルチゾンアセテート	120	017 (71倍)
ハイドロコルチゾン	110	016 (69)
プレドニゾン	130	008 (163)
メチルプレドニゾン	115	003 (383)
メチルプレドニゾン	060	003 (180)
テトラハイドロ	100	001 (1000)
プロゲステロン	102	049 (21)
プロゲステロンアセテート	112	042 (27)
17β-エストラジオール	196	028 (70)
フルオキシメチステロン	124	012 (103)
5α-アンドロステロン	232	029 (8)

特開463-119500 (10)

この結果から明らかに、用量依存性的な血管新生抑制作用が認められた。

実施例6

血管新生阻止作用 (in vivo 法) :

実施例5と同様に、ステロイドと DS 4152 を併用した場合の効果について調べた。ステロイドとしては、酢酸コルチゾン を500mg/kgの割合で用い、DS 4152 は300mg/kg又は3000mg/kgとなるよう調整して加えた。また、比較と CDF 4639 及びE 画分を用いた。この結果を第8表に示す。また、表甲の数は、生理食塩水を同量投与した対照マウスより採取した血漿を添加した後、鼠腹血管の発達度を100%とした時の阻止率である。

実施例5

血管新生阻止作用 (in vivo 法) :

DS 4152 を生理食塩水に溶解し、ICR系雄マウスに皮下もしくは経口で投与し、6時間後に血漿を採取した。0.313%ノエン酸ナトリウムで凝固を阻止し、直接法と同様に5日齢受胎期母鼠腹膜に添加し、2日後に判定した。この結果を第7表に示す。

第7表

投与ルート	投与量 (mg/kg)	血管新生阻止率 (%)
経口	3	-5.9
	30	26.4
	300	62.7
皮下	3	1.6
	30	37.8
	300	66.1

第8表

投与ルート	DS 4152	DF 4639	E 画分
皮下	92.2%	83.3%	86.8%
経口	92.7%	86.8%	82.8%

DS 4152 と及び DF 4639 は経口、皮下いずれの経路によっても鼠腹膜血管新生を抑制することが認められた。

実施例7

血管新生阻止作用 (in vivo 法) :

ICR系雄マウスに、生理食塩水に溶解した DS 4152 を経口投与した。ステロイドは、DS 4152 と共にまたは単独で、生理食塩水に溶解して経口または腹腔内投与した。投与6時間後に採血し、0.313%ノエン

酸ナトリウムで凝固を阻止し、これを直接法と同様に5日齢受胎期母鼠腹膜に添加し、2日後に血管新生に及ぼす効果を確認した。結果は、同量の生理食塩水のみを投与したマウスに、6時間経過後の血漿を加えた場合の鼠腹膜血管の発達度を対照とし、阻止百分率で示した。この結果は第9表の通りである。

以下余白

実施例8

試験方法：

CS71L/6雄マウスに同系の雌鼠を1匹、水浴槽に5076を1×10°濃度で溶解し、3日目より0.4152を30ml/4日1回、6回皮下投与したところ、著名な抗腫瘍効果と生存日数の有意な延長が認められた。すなわち第10日に示すように移植21日目の腫瘍平均重量は対照群の37% (63%抑制) であり、かつノドリン生存日数が対照群より33%延長した。

腫瘍平均重量は、腫瘍長の長軸と短軸の長さを測定し、以下の式から求めた。

$$\text{腫瘍平均重量} = (\text{長軸}) \times (\text{短軸})^2 \times \frac{1}{2}$$

実施例9

試験方法：

ICR系統マウス (8週齢) にインコーマ180 (8180) を1×10°濃度で溶解し、3日目より0.4152の生理食塩水懸濁液を250ml/4日/80割合で3日間、100ml/4日/80割合で1日投与した。

0.4152は生理食塩水に溶解し、0.61もしくは0.1ml/マウスとなる様1日1回皮下もしくは腹腔にて4日間投与した。移植7日に移植して腫瘍重量を対照と比較したところ第11日に示す如く0.4152のみを投与した群では腫瘍重量は生理食塩水投与群と差がなかったが、さらに0.4152を投与することにより腫瘍増殖抑制作用が得ら

表10

物質名 (ルート)	投与量 (mg/kg)	DE 4152投与量 (mg/kg; p.o.)		腫瘍増殖抑制率 (%)
		対照群	投与群	
コナソノチン (p.o.)	0	0	30	77
コナソノチン (p.o.)	1	0	30	75.1
コナソノチン (p.o.)	0	0	30	-26
コナソノチン (p.o.)	0	0	30	71.7
コナソノチン (p.o.)	0	0	30	-123
コナソノチン (p.o.)	0	0	30	80.7
コナソノチン (p.o.)	0	0	30	40
コナソノチン (p.o.)	0	0	30	82
コナソノチン (p.o.)	0	0	30	184
コナソノチン (p.o.)	0	0	30	224
コナソノチン (p.o.)	0	0	30	242
コナソノチン (p.o.)	0	0	30	276

表10A

物質名	投与量 (mg/kg)	腫瘍重量 (mg)	生存日数 (日)	腫瘍抑制率 (%)
対照群	0	230±118 (100)	0	0
DE 4152	30	148±108 (37)	23	33

(A) 移植21日目の平均腫瘍重量と生存日数、(B) は平均腫瘍重量。

(C) (A) 物質投与後のノドリン生存日数/対照群のノドリン生存日数-1) × 100

れ、貯蔵時の減量率の6.9～17.5%であった。

表 11 例

処 理	減 量 率	
	平均値±標準偏差	T/C%
生体食塩水 (p.p.)	Q361± Q191	1000
生体食塩水 (p.p.)	Q361± Q123	1000
酢酸コチゾン	Q340± Q162	94.2
0.5 4152 (Q61mg/0.01ml p.p.)	Q361± Q070	1000
0.5 4152 (Q1mg/0.01ml p.p.)	Q261± Q077	72.3
0.5 4152 (Q61mg/0.01ml p.p.) +酢酸コチゾン	Q063± Q016	17.5*
0.5 4152 (Q1mg/0.01ml p.p.) +酢酸コチゾン	Q028± Q011	7.4*
0.5 4152 (Q61mg/0.01ml p.p.)	Q322± Q071	82.4
0.5 4152 (Q1mg/0.01ml p.p.)	Q358± Q115	90.8
0.5 4152 (Q61mg/0.01ml p.p.) +酢酸コチゾン	Q063± Q036	16.1**
0.5 4152 (Q1mg/0.01ml p.p.) +酢酸コチゾン	Q036± Q016	49.0**

* P<0.05, ** P<0.01 スタートメントによる検定による

減量した試料とする。

実施例 12

試料:

0.5 4152 6mg, プレフェゾン20mg, 乳糖50mg, トクモコリン1.5mg, カルシウム30mg, ビタミンC30mg, ビタミンE3mg及びステアリン酸マグネシウム0.5mgを常法に従って混合、打錠し、1錠とする。

4. 図面の簡単な説明

第1図ないし第4図は高速ゲル透過クロマトグラムである。

以上

特開 昭 53-119500 (12)

実施例 10

試料:

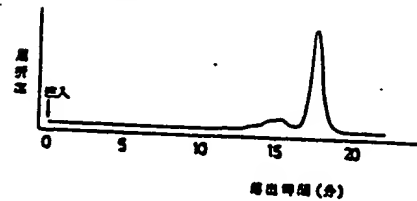
0.5 4152 6mg, 乳糖300mg, トクモコリン1.44mg, カルシウム30mg及びビタコリン30mgを用い、常法に従って500mgの錠剤を調製した。この錠剤は錠状にわけて1850mg～5mgを服用する。

実施例 11

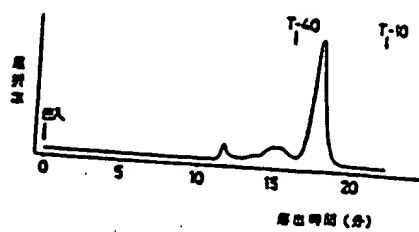
試料:

0.5 4152 1.2mg, 塩化ナトリウム90mgを注射用蒸留水に溶解し、10mlとする。この溶液をノンアランフィルムで透過した後、アンプルに充填し、115℃で30分間

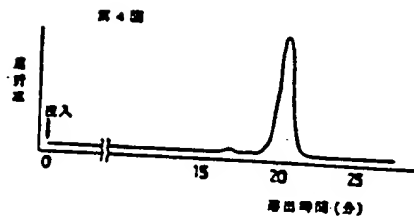
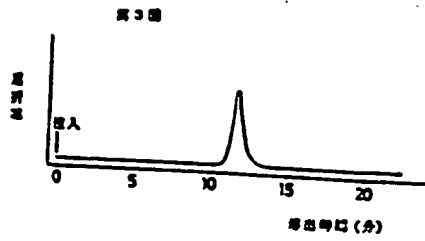
第 1 図



第 2 図



資料 63-119500 (13)



第1頁の続き

④Int. Cl.°

A 61 K 31/725
37/02
C 08 B 37/00
C 12 P 19/04
I(A 61 K 31/725
31:58)

識別記号

ADU
ABE

庁内整理番号

8615-4C
6779-4C
C-8515-4B
7252-4C

④発 明 者 小 河

秀 正

東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究
所内